

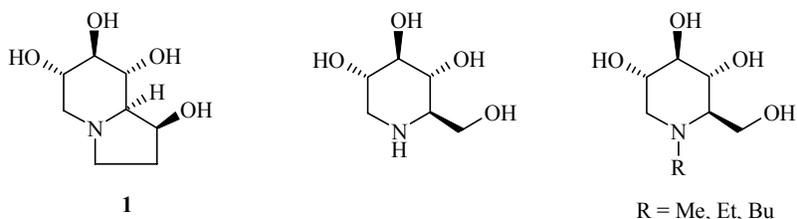
П. Б. Терентьев, Т. М. Зильберштейн, А. А. Борисенко,
В. А. Шморгунов, Н. Ф. Пискункова, Г. В. Гришина

ТРАНСФОРМАЦИЯ 1,2,5,6-ТЕТРАГИДРОПИРИДИНОВ МИЦЕЛЛИАЛЬНЫМИ ГРИБАМИ

Показано, что при биотрансформации серии 1,2,5,6-тетрагидропиридинов с помощью штаммов мицелиальных грибов *Cunninghamella verticillata* ВКПМ F-430, *Beauveria bassiana* ATCC 7159 и *Penicillium simplicissimum* КМ-16 наибольшей трансформирующей активностью и селективностью обладает культура грибов *Cunninghamella verticillata*. С помощью последней происходит практически количественное окисление 1,2,5,6-тетрагидропиридинов в соответствующие *транс*-диоли. Структура и пространственное строение *транс*-1-бензил-3,4-дигидроксипиперидина доказана данными хромато-масс-спектрометрического анализа и спектрами ЯМР высокого разрешения и подтверждена сравнением с заводским образцом, полученным встречным синтезом окислением 1-бензил-1,2,5,6-тетрагидропиперидина надтрифторуксусной кислотой.

Ключевые слова: пиперидиндиол, 1,2,5,6-тетрагидропиперидин, мицелиальные грибы, биотрансформация, гидроксילирование.

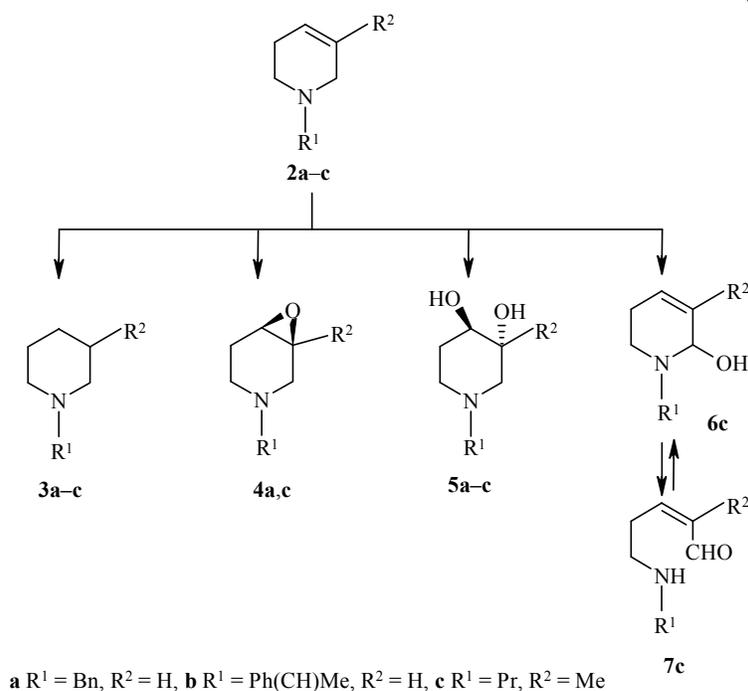
Функционализированные производные пиперидина принадлежат к классу природных и синтетических веществ с чрезвычайно широким спектром биологической активности [1]. В последнее время особое внимание привлекли полигидроксильированные производные пиперидина (азасахара), например каштаноспермин **1** и его аналоги, у которых найдена высокая анти-ВИЧ-активность [2, 3].



В связи с этим в настоящем сообщении представлены данные по исследованию ферментативных путей синтеза и стереохимии структурно и стереохимически более простых аналогов каштаноспермина – *транс*-3,4-дигидроксипиперидинов – путем биотрансформации растущими культурами клеток штаммов мицелиальных грибов *Cunninghamella verticillata* ВКПМ F-430 (**C**), *Beauveria bassiana* ATCC 7159 (**B**) и *Penicillium simplicissimum* КМ-16 (**P**) серии 1,2,5,6-тетрагидропиридинов (ТГП). В качестве субстратов выбраны 1-бензил-1,2,5,6- (**2a**), 1-(1-фенилэтил)-1,2,5,6- (**2b**) и 3-метил-1-пропил-1,2,5,6-ТГП (**2c**), так как грибы родов *Beauveria*, *Cunninghamella*, *Penicillium* и др. способны гидроксильировать [4, 5] или гидратировать [6] кратные связи ТГП.

Хромато-масс-спектральный анализ полученных экстрактов после инкубации культурами грибов **С**, **В** и **Р**, соответственно, позволил установить, что все N-замещенные ТГП **2a–c** претерпевали разнообразные превращения (схема 1).

Схема 1



Как видно из приведенных в табл. 1 данных, максимальные трансформирующая активность и селективность наблюдались для штамма **С**, трансформация им трех ТГП **2a–c** проходила практически полностью. Оба содержащих N-аралкильный заместитель соединения **2a** и **2b** трансформировались культурой гриба **С** практически полностью и региоселективно в *транс*-3,4-дигидроксипроизводные **5a** и **5b**.

Т а б л и ц а 1

Состав продуктов биотрансформации соединений **2a–c** культурами грибов **Р**, **В**, **С** в смеси (время удерживания, мин)

Грибы	Соединение, %								
	3a	3b	3c	4a	4c	5a	5b	5c	6c
<i>Penicillium</i> (Р)	–	–	1.0 (3.41)	–	–	–	–	1.0 (7.34)	–
<i>Beauveria</i> (В)	2.4 (5.88)	2.0 (5.88)	7.0 (3.41)	0.6 (7.11)	–	–	–	4.0 (7.33)	–
<i>Cunninghamella</i> (С)	–	–	–	–	22.0 (4.50)	97.6 (8.34)	100 (8.46)	19.0 (7.34)	59.0 (4.90)

Селективность нарушалась только для соединения **2c** – наблюдалось образование трех соединений: 3-метил-1-пропил-3,4-эпоксипиперидина (**4c**), продукта его гидратации (соединения **5c**) и 2-метил-5-пропиламино-2-пентенала (**7c**), представляющего преобладающую (в газовой фазе) линейную таутомерную форму 2-гидрокси-3-метил-1-пропил-1,2,5,6-ТГП (**6c**).

Наименее активной оказалась культура **P**, которая совершенно не затрагивала соединения **2a** и **2b**, а соединение **2c** только на 1% превращала в *транс*-3,4-дигидрокси-3-метил-1-пропилпиперидин (**5c**) и на 1% в 3-метил-1-пропилпиперидин (**3c**). Эти же соединения были найдены среди продуктов трансформации субстрата **1c** культурой гриба **B**, но в соотношении **2c–5c–3c**, 89:4:7. Предположение о *транс*-строении дигидроксипроизводного **5c** было высказано с учетом очень высокой стабильности его молекулярного иона [7].

В незначительной степени аналогичное восстановление кратной связи культура **B** осуществляла и при трансформации соединений **2a** и **2b**. Среди продуктов биотрансформации **2b** культурой **B** идентифицировано присутствие 2% 1-(1-фенилэтил)пиперидина (**3b**). В случае соединения **2a** в культуральной жидкости кроме исходного субстрата обнаружены 1-бензилпиперидин (**3a**), а также 1-бензил-3,4-эпоксипиперидин (**4a**). Обнаружение такого эпоксида позволяет предположить, что дигидроксипроизводное **5c** образовалось в результате гидратации аналогичного эпоксида 1,2,5,6-ТГП **4c**.

Подчеркнем, что в структуре **2c** присутствуют только алифатические радикалы и отсутствует карбонильная группа, что ставит под сомнение гипотезу о том, что для успешной селективной трансформации культурой **B** ненасыщенных гетероциклов необходимо наличие в их структурах карбонильной группы и (или) ароматического фрагмента [8–10]. В то же время в работе [6] также была установлена полная индифферентность культуры **B** при попытках осуществить трансформацию 1-бензилоксикарбонил-1,2,5,6-ТГП.

Культуры грибов **P** и **B** способны осуществлять лишь в незначительной степени неселективную трансформацию таких субстратов.

Таким образом, найдено, что культура *Cunninghamella verticillata* ВКПМ F-430 (**C**) региоселективно и практически с количественным выходом дигидроксилирует кратную связь в замещенных 1,2,5,6-ТГП **2a–b**. Именно эту культуру гриба **C** следует применять в дальнейшем для препаративной биотрансформации ТГП.

Для строгого определения пространственного строения диола **5a** мы осуществили встречный синтез *транс*-1-бензил-3,4-дигидроксипиперидина (**8a**) окислением борфторида соединения **2a** надтрифторуксусной кислотой. Образцы *транс*-1-бензил-3,4-дигидроксипиперидина, полученные биотрансформацией и синтетически, показали одинаковую хроматографическую подвижность и практически идентичные масс-спектры и спектры ЯМР ¹H. Сравнение химических сдвигов и их отнесение для обоих образцов соединений представлены в табл. 2.

Спектры ЯМР ^1H образцов соединения **5a**

Соединение 5a	Химические сдвиги, δ , м. д.							
	2-Н	3-Н	4-Н	5-Н	6-Н	PhCH	ОН	Ag-Н
Продукт биотрансформации	a 1.92	3.52	3.32	a 1.55	a 2.02	3.48	4.4	7.3
	e 2.93			e 1.83	e 2.73			
Синтетический образец	a 1.98	3.56	3.40	a 1.59	a 2.08	a 3.51	3.2	7.3
	e 2.94			e 1.90	e 2.75	b 3.53		

Аксиальная ориентация протонов при 3- и 4-Н в 3,4-дигидроксипиперидине **5a** установлена на основании больших значений вицинальных КССВ $^3J_{2a3} = 10.3$, $^3J_{5a4} = 11.1$, $^3J_{34} = 8.9$ Гц. На этом основании определена диэкваториальная ориентация 3,4-дигидроксильных групп, что свидетельствует о получении именно *транс*-изомера синтетического 3,4-дигидроксипиперидина **5a**. Аналогичный вывод о *транс*-строении сделан и для продукта биотрансформации **5a**, имеющего практически такие же значения КССВ $^3J_{2a3} = 10.2$, $^3J_{5a4} = 9.6$, $^3J_{34H} = 9.8$ Гц, что доказывает идентичность обоих образцов.

Таким образом, показано, что N-замещенные 1,2,5,6-ТГП с помощью биотрансформации могут быть регио- и стереоселективно превращены в *транс*-3,4-диолы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Хромато-масс-спектры сняты на приборе HP-5990 с масс-селективным детектором HP-5972, кварцевая капиллярная колонка 30 м \times 0.2 мм с неподвижной фазой HP-5MS и программированием температуры от 70 до 250 $^{\circ}\text{C}$ со скоростью 30 $^{\circ}/\text{мин}$.

Спектры ЯМР ^1H записаны на приборе Varian VXR-400 (400 МГц) в CDCl_3 , внутренний стандарт ТМС.

1,2,5,6-Тетрагидропиридины 2a,c синтезируют последовательной кватернизацией пиридина и 3-пиколина, соответственно, бензилхлоридом и пропилбромидом в абсолютном ацетонитриле, выделенные соли после перекристаллизации из смеси этилацетат-эфир восстанавливают боргидридом натрия в абсолютном этаноле при 0 $^{\circ}\text{C}$ [11, 12]. Этанол упаривают в вакууме, к остатку добавляют воду и дважды экстрагируют эфиром, объединенные вытяжки сушат безводным MgSO_4 , фильтруют, растворитель упаривают, остаток перегоняют в вакууме.

Соединение 2a: выход 60%. Т. кип. 101–102 $^{\circ}\text{C}$ (2 мм рт. ст.), R_f 0.85 (Silufol, бензол-ацетон, 2:1). ИК спектр (в тонком слое), ν , cm^{-1} : 1670 (C=C). Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$, %) (путь образования): 173 (57) (M^+), 96 (60) ($\text{M}-\text{C}_6\text{H}_5$) $^+$, 91 (100) (C_7H_7) $^+$, 84 (17), 82 (21) ($\text{M}-\text{C}_7\text{H}_7$) $^+$, 70 (16), 65 (14), 58 (14), 44 (28), 42 (23), 41 (19) [13].

Соединение 2c: выход 75%. Т. кип. 85–88 $^{\circ}\text{C}$ (30 мм рт. ст.), R_f 0.3 (Silufol, бензол-ацетон, 2:1). ИК спектр (в тонком слое), ν , cm^{-1} : 1667 (C=C). Масс-спектр, m/z : 139 (11) (M^+), 124 (5) ($\text{M}-\text{CH}_3$) $^+$, 110 (100) ($\text{M}-\text{C}_2\text{H}_5$) $^+$, 94 (5), 81 (4), 68 (5), 67 (7), 42 (20), 41 (8).

1-(1-Фенилэтил)-1,2,5,6-тетрагидропиридин (2b). К раствору 2.6 г (1.18 ммоль) 1-(1-фенилэтил)пиридинийхлорида (получен кипячением в бутаноле эквивалентных количеств 1-(2,4-динитрофенил)пиридинийхлорида (соль Цинке) с 1-фенилэтиламином с 70% выходом) в 30 мл абсолютного этанола прибавляют порциями 0.9 г (2.4 ммоль)

натрийборгидрида при 0 °С, перемешивают 30 мин, этанол упаривают в вакууме, к остатку прибавляют 20 мл воды, экстрагируют хлористым метиленом (3 × 15 мл), объединенные органические экстракты высушивают безводным MgSO₄, растворитель упаривают и остаток перегоняют в вакууме, получают 1.5 г (65%) соединения **2b**. Т. кип. 95–96 °С (2 мм рт. ст.). Хлоргидрат: т. пл. 223–224 °С. Найдено, %: С 69.96; Н 8.04; N 5.93. C₁₃H₁₈ClN. Вычислено %: С 69.79; Н 8.10; N 6.26. Масс-спектр, *m/z*: 187 (14) (M⁺), 172 (100) (M–CH₃)⁺, 118 (16), 110 (24) (M–C₆H₅)⁺, 106 (8), 105 (85) (C₈H₉)⁺, 104 (13), 91 (32), 82 (34) (M–C₈H₉)⁺, 79 (26).

1-Бензил-3,4-дигидроксиперидин (5a). К раствору 4 г (23.1 ммоль) 1-бензил-1,2,5,6-ТГП **2a** в 12 мл абсолютного CH₂Cl₂ при –50 °С прибавляют 2.98 мл (3.28 г, 23.1 ммоль) BF₃·Et₂O. Перемешивают 5 мин при –50 °С и 20 мин при комнатной температуре. Прибавляют 0.9 г (4.4 ммоль) трифторацетата триэтиламония, затем 20 мл 1.7 моль/л раствора надтрифторуксусной кислоты в хлористом метиле. Кипятят 1 ч 30 мин. Избыток окисляющего агента разлагают 0.86 г (13.9 ммоль) диметилсульфида, нейтрализуют при 0 °С 10% NaOH до pH 11. Органический слой отделяют, водный слой экстрагируют хлористым метиленом (5 × 15 мл). Органические вытяжки объединяют и высушивают безводным MgSO₄. Отфильтровывают, растворитель упаривают, получают 2.38 г (50%) 1-бензил-3,4-дигидроксиперидина в виде белых кристаллов, т. пл. 96–97 °С (из смеси гексан–этилацетат, 1:1). *R_f* 0.6 (Silufol, CHCl₃–MeOH, 3:1). ИК спектр (CCl₄), *v*, см^{–1}: 3605, 3630 (ОН). Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, CDCl₃), *δ*, м. д. (*J*, Гц): 1.55 (1H, д. к, *J*_{5a6a} = 11.6, *J*_{5a5c} = 11.9, *J*_{4a5a} = 11.1, *J*_{5a6c} = 3.4, 5-H *a*); 1.83 (1H, д. к, *J*_{4a5c} = 3.9, 5-H *e*); 1.92 (1H, т, *J*_{2a2c} = 10.6, *J*_{2a3a} = 10.3, 2-H *a*); 2.02 (1H, д. т, *J*_{6a6c} = 11.4, *J*_{5c6a} = 1.9, 6-H *a*); 2.73 (1H, д, 6-H *e*); 2.93 (1H, д. д, *J*_{2c3a} = 2.9, 2-H *e*); 3.32 (1H, д. т, *J*_{3a4a} = 8.9, 4-H *a*); 3.48 (2H, с, Ph–CH₂); 3.52 (1H, т. д, 3-H *a*); 4.4 (2H, уш. с, ОН); 7.3 (5H, м, Ar–H). Найдено, %: С 69.72; Н 8.24; N 6.42. C₁₂H₁₇NO₂. Вычислено, %: 69.54; Н 8.27; N 6.76.

Биотрансформацию осуществляют в растущей культуре клеток штаммов **P**, **B**, **C** при pH 5.0 по методикам [6, 8]. Для каждого субстрата и культуры производили два параллельных опыта. Субстрат (соединения **2a–c**) для трансформации в виде гидрохлорида вносят в количестве 100 мг/л, объем культуральной жидкости для одной пробы составляет 100 мл. После окончания процесса клетки отфильтровывают, фильтрат подкисляют соляной кислотой до pH 3, упаривают до объема 7–10 мл и экстрагируют хлороформом (3 × 10 мл) для удаления примесей неосновного характера, водный слой подщелачивают 10% раствором NaOH до pH 11 и экстрагируют хлороформом (6 × 10 мл). Объединенные хлороформные вытяжки сушат безводным MgSO₄, упаривают до 2 мл и анализируют методом хромато-масс-спектрометрии.

Масс-спектры идентифицированных соединений (схема 1):

3a. 175 (26) (M⁺), 174 (41) (M–H)⁺, 146 (5), 132 (4), 98 (27) (M–C₆H₅)⁺, 91 (100) (C₇H₇)⁺, 84 (18), 65 (22), 43 (15), 41 (14).

3b. 189 (7) (M⁺), 174 (100) (M–CH₃)⁺, 112 (6), 105 (100) (C₈H₉)⁺, 91 (4), 84 (3), 77 (3).

3c. 141 (7) (M⁺), 140 (4), 112 (100) (M–C₂H₅)⁺, 84 (3) (M–C₄H₉)⁺, 70 (3), 43 (4), 42 (5).

4a. 189 (5) (M⁺), 146 (3) (M–C₂H₅O)⁺, 138 (8), 118 (7) (M–C₄H₇O)⁺, 112 (6) (M–C₆H₅)⁺, 91 (100) (C₇H₇)⁺, 89 (10), 77 (12), 65 (27), 63 (15), 55 (26), 51 (24), 41 (32).

4c. 155 (12) (M⁺), 126 (95) (M–C₂H₅)⁺, 116 (34), 115 (39), 98 (100) (M–C₃H₅O)⁺, 96 (23), 84 (43) (M–C₄H₇O)⁺, 83 (31), 69 (23), 44 (32), 43 (56), 42 (48), 41 (53).

5a. 207 (22) (M⁺), 206 (14), 190 (15) (M–OH)⁺, 172 (5) (M–OH–H₂O)⁺, 154 (27), 146 (7), (M–C₂H₅O₂)⁺, 134 (7), 130 (14) (M–C₆H₅)⁺, 116 (21) (M–C₇H₇)⁺, 98 (8), 91 (100) (C₇H₇)⁺, 70 (27), 65 (10), 43 (7), 41 (10).

5b. 221 (3) (M⁺), 206 (100) (M–CH₃)⁺, 204 (1) (M–OH), 144 (20) (M–C₆H₅)⁺, 116 (5) (M–C₈H₉)⁺, 106 (6), 105 (51) (C₈H₉)⁺, 103 (9), 91 (27), 79 (11), 77 (14) (C₆H₅)⁺.

5c. 173 (95) (M⁺), 155 (18) (M–H₂O)⁺, 143 (8), 142 (11), 138 (51) (M–H₂O–OH)⁺, 129 (12), (M–CH₃COH)⁺, 128 (10), 125 (21), 115 (26), 112 (24), 111 (47), 99 (98), (M–C₃H₆O₂)⁺, 97 (30), 83 (48), 55 (100) (C₃H₅N)⁺, 43 (58).

6c. 155 (3) (M⁺), 126 (100) (M–C₂H₅)⁺, 116 (4), 115 (6), 112 (3), 98 (2), 84 (11) (M–C₄H₉N)⁺, 70 (4), 55 (6), 43 (21), 42 (10), 41 (8).

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант № 98-03-33026а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. W. Daly, H. M. Garraffo, T. F. Spande, in *The Alkaloids*, G. Cordell, Ed. Acad. Press, San Diego, **43**, 185(1993).
2. D. Walker, M. Kowalski W. C., Goh, K. Kozarsky, M. Kreieger, C. Rosen, Rohrschneider, L. R. Rohrschneider, W. A. Haseltine, J. Sodroski, *J. Proc. Natl., Acad. Sci., USA*, **84**, 8120 (1987).
3. R. M. Ruprecht, S. Mullaney, J. Andersen, R. J Bronson, *Acquired Immune Defc. Syndr.*, **2**, 149 (1989).
4. S. J. Aitker, G. Grogan, C. S.-Y. Chow, N. J. Turner, S. I. Flitsc. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 3365 (1998).
5. П. Б. Терентьев, И. А. Паршиков, Г. В. Гришина, Н. Ф. Пискункова, Т. И. Чумаков, Г. А. Булахов, *ХГС*, 711 (1997).
6. Л. В. Модянова, М. Р. Дудучава, Н. Ф. Пискункова, Г. В. Гришина, П. Б. Терентьев, И. А. Паршиков, *ХГС*, 649 (1999).
7. J. Splitter, F. Turecek, in *Applications of Mass Spectrometry to Organic Stereochemistry*, VCH, New York, 1994.
8. G. S. Fonken, R. A. Johnson, in *Chemical Oxidation with Microorganisms*, VCH, Germany, 1972.
9. B. Vigne, A. Archelas, R. Furstoss, *Tetrahedron*, **47**, 1447 (1991).
10. R. Furstoss, A. Archelass, J. D. Fourneron, B. Vigne, in *Enzymes as Catalysts in Organic Chemistry*, NATO ASI Series, Ed. P. Schneide, **178**, 361 (1986).
11. H. Oediger, Joop N. Joop, *Liebigs Ann. Chem.*, **764**, 21 (1972).
12. R. Lukes, *Collect. Czechosl. Chem. Commun.*, **12**, 71 (1947).
13. Л. Г. Юдин, *ЖОХ*, **27**, 3021 (1957).

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова, Москва 119899,
Россия
e-mail: grishina@org.chem.msu.su

Поступило в редакцию 12.01.2001